

⑫ 公開特許公報(A) 平1-231887

⑤ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)9月18日

C 12 N 9/64
C 12 P 21/00Z-7823-4B
J-6712-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 17 (全24頁)

⑭ 発明の名称 タンパク質の調製法

⑯ 特 願 昭63-256882 ✓

⑰ 出 願 昭63(1988)10月12日

優先権主張 ⑱ 1987年10月13日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3734632.6 ✓

㉑ 発 明 者 アンドレア シュテツ ドイツ連邦共和国 デー7950 ビベラツハ1 ラウシュト
ヒエル シーリング ラーセ 5

㉒ 発 明 者 ロルフ ギュンター ドイツ連邦共和国 デー 7950 ビベラツハ1 フーゴ
ヴェルネル ヘーリング ヒュトラーセ72

㉓ 出 願 人 ドクトル カルル ト ドイツ連邦共和国 デー 7950 ビベラツハアン デル
ーマエ ゲゼルシャフ リス(番地なし)
ト ミット ベシユレ
ンクテル ハフツング

㉔ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外8名
最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称 タンパク質の調製法

2. 特許請求の範囲

- (1) 使用するタンパク質誘導物質が、チオグリコール酸、チオジグリコール酸、L-システイン、グルタチオン、臭化ブチリルクロライン、塩化ブチリルクロライン、ノナクチン酸、フラン脂肪酸、アスコルビン酸、アフィジコリン、6-ヒドロキシ-4, 6-ジメチル-3-ヘプテン-2-オン、フザリン酸、メバロン酸、トランス-アンヒドロメバロン酸、アンヒドロメバロン酸ラクトン、シス-アンヒドロメバロン酸ラクトン、D-α-ヒドロキシ置換(C₃又はC₄)脂肪酸モノ又はジカルボン酸又はその塩であることを特徴とする、タンパク質の生産を誘導する物質を、細胞培養物に添加することにより、タンパク質を生産する細胞の培養物中のタンパク質の生産を増加する方法。
- (2) C₃、-C₄脂肪酸モノカルボン酸又はその塩を、その培養物に添加することを特徴とする、

トランスホームしたCHO細胞培養物からのタンパク質の生産を増加する方法。

- (3) タンパク質がt-P A又はその変異体であることを特徴とする、請求項(2)記載の方法。
- (4) トランスホームしたCHO細胞を培養することを特徴とする、請求項(1)記載の方法。
- (5) タンパク質がt-P A又はその変異体であることを特徴とする、請求項(4)記載の方法。
- (6) タンパク質誘導物質として、チオグリコール酸又はその塩を使用することを特徴とする、請求項(5)記載の方法。
- (7) タンパク質誘導物質として、ノナクチン酸又はフラン脂肪酸又はその塩を使用することを特徴とする、請求項(5)記載の方法。
- (8) タンパク質誘導物質として、酪酸又はその塩を使用することを特徴とする、請求項(2)又は(3)記載の方法。
- (9) 培養を無血清培地で行うことを特徴とする、請求項(1)乃至(8)記載の方法。
- (10) 培養を血清含有培地で行うことを特徴とする、

請求項(1)乃至(8)のいずれか1項に記載の方法。

- 00 培養物中に、タンパク質誘導物質を、
0.005 μ Mから500 mMの濃度範囲で添加することを特徴とする、請求項(1)乃至(10)記載の方法。
- 02 C₁-4脂肪酸モノカルボン酸又はその塩を、
1 mMから10 mMの濃度範囲で添加すること
を特徴とする、請求項(11)記載の方法。
- 03 チオグリコール酸、チオジグリコール酸、
L-シスチン又はグルタチオン又はそれらの塩
を、1 mMから10 mMの濃度範囲で添加する
ことを特徴とする、請求項(11)記載の方法。
- 04 細胞を、タンパク質誘導物質のうちの1つの
存在下培養し、その細胞を培養物から取り出し、
ついで、新しい培養培地に移し、それらの物質
のうちの1つの存在下培養することを特徴とす
る、請求項(1)乃至(13)のいずれか1項
に記載の方法。
- 05 アフィジコリンが第1に述べた物質であり、

かつ、第2の物質が酪酸、プロピオン酸、塩化
ブチリル・コリン又は、臭化ブチリルコリン又
はそれらの塩であることを特徴とする、請求項
(14)記載の方法。

- 06 それらの物質を2つ以上同時に使用すること
を特徴とする、請求項(1)乃至(13)のい
ずれか1項に記載の方法。
- 07 酪酸及びチオグリコール酸又はそれらの塩を
使用し、第2の物質として、その培養物に酪酸
を添加することを特徴とする、請求項(16)
記載の方法。

3.発明の詳細な説明

本発明は、特に、t-PA(組織プラスミノー
ゲン活性化因子)のようなプラスミノーゲン活性
化因子等のタンパク質の調製法で、特に、タンバ
ク質合成のための細胞培養(例えばCHO細胞)
の生産性を向上させる方法に関するものである。

プラスミノーゲン活性化因子は、A-560と
Val-561の間のペプチド結合を切断すること
により、活性酵素プラスミンとする、プロ酵素プ
ラスミノーゲンを活性化する一種のセリン・プロ
テアーゼである。逆に、プラスミンは、凝血のフ
ィブリン構造を分解して、可溶性のペプチドとす
る血液の繊維素溶解システムの最終段階である
とすることができる。

冠動脈性の病気のような病原性の病気では、凝
血は、その組織が適量の酸素の供給を受けるこ
とを保證するのに十分早く、破壊される。凝血に
よる冠動脈の閉鎖は、不適正な結果を引き起こ
すが、一方、心筋への酸素供給の欠乏は、影響を
受ける組織の壊死を意味する。

血管の迅速な再開は、短時間内での、心筋への
血液供給を保證し、従って、心筋の全セクション
が死ぬの防ぐ。

現在まで、ストレプトキナーゼ及びウロキナー
ゼがこの治療に使われてきた。しかし、t-PA
の性質は、これら従来のプラスミノーゲン活性化
因子以上の有利性をもっている；フィブリン特異
的部位の溶解、フィブリン分解によって引き
起こされる組織溶解効果の欠除及び抗体形成の
欠除。

t-PAは、527アミノ酸残基からできてい
る、1本鎖又は2本鎖で生成する、約65,000ダ
ルトンの分子量を有するグリコプロテインである。

t-PAのプラスミノーゲンに対する親和性は、
フィブリン不在下よりもフィブリン存在下の方
が約100倍大きい。フィブリン存在下での、この
t-PAのプラスミノーゲンに対する親和性は、
末梢における遊離プラスミノーゲンを活性化す
ることなしに、効果的な活性化を保證している。

まず、ヒトのt-PAを、子宮から純粋な形で

入手する。また、t-P Aは、他の組織又は、例えば動脈及び静脈内皮細胞を含む内皮細胞などの細胞にも検出される。しかし、形成するt-P A量は非常に少ないため、それらを商業的規模で入手するのは、不可能である。

他の天然のt-P A源は、細胞培養である。可能性のあるt-P A生産のため、多くの細胞系列が研究されてきた(グロノー (Gronow)、M等、トレンド・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology)、1巻、26~29頁、1983年)。限定された臨床的研究及び、ヒトの細胞系列、及びその構造研究のため、ヒトの細胞系列、主にボウズ・メラノーマ細胞から、相当量のt-P Aが得られた(ワレン (Wallen) 等、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)、132巻、681-686頁 (1983年))。

しかし、これらの収量でも、広汎な臨床的使用のための大規模生産に対しては、少なすぎる。

遺伝子工学によってのみ、治療のための組織

t-P Aをより多量に生産することが可能である。

1983年、t-P Aをクローン化し、そのアミノ酸配列が決定された(ベニカ (Pennica)、ネイチャー (Nature)、301巻、214~221頁、1983年)。

メラノーマ細胞由来のt-P Aの遺伝的情報が組込まれた大腸菌からt-P Aを得る試みは、生じたタンパク質がグリコシル化されておらず、結果的に天然のt-P Aに対応していないことから、不成功に終わった。

この理由で、ヒトのt-P Aの生産を研究している、多くの研究グループは、様々な種に由来する、耐久性のあるホ乳類細胞系列を探し求めた。これらの細胞系列のうちのいくつかは、明らかに、t-P Aの収率の向上した、ヒトの細胞系列である。他のものは正常なチャイニーズハムスターの卵巣細胞である。

刊行されている、ヨーロッパ特許出願第0093619号は、トランスホームしたチャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞 (CHO細胞) からの

t-P Aの調製について報告している。生成したt-P A (r-t-P A) は、天然のものと、なんら変りはなかった。

いくつかの刊行物は、t-P Aの変異体及びその調製法について報じている; EP-A241,208、241,209、241,210、240,334、234,051、233,013、231,624、225,286、213,794、201,153、199,574、196,920、及び DE-A3708681。

本出願は、天然のt-P A中の同じ位置のアミノ酸と異なる1つ以上のアミノ酸をそれらが含んでいるか、又は、天然に生じる1つ以上のアミノ酸がそれら変異体中に見られないこととは関係なしに、変異株としての全てのt-P A誘導体に関して言及している。天然に生じるt-P Aの多くのアミノ酸を欠くt-P A、(例えばEP-A-196,920参照) は、しばしば、"分殖種" と呼ばれる。

例えば、EP-A199,574は、部位270から279に、天然のt-P Aの対応する部位のアミ

ノ酸と異なるアミノ酸を有するt-P A変異体について報じている。

DE-A3708681では、出願者は、部位117に、天然のt-P Aの対応する部位のアミノ酸と異なるアミノ酸を含み、一方、天然のt-P Aと異なり、その変異体t-P Aは、この部位がグリコシル化されていない、いくつかのt-P Aを調製している。

多くの出願者は、タンパク質合成に対する細胞培養の生産性に関する、種々の物質の影響について報じている。

種々の細胞システムにおいて、細胞内c-AMPレベルとt-P A合成の間に相関があると報じられており(例えばクーイストラ (Kooistra) 等、トロンボシスとヘモスタシス、54巻(1)、192頁、概要p1133)、また、ヒトの内皮細胞中、ジブチリルc-AMPは、t-P Aの生産を2~3倍増加させるが、ボウズ・メラノーマ細胞においては、t-P A合成に影響を与えないと報じられている。腎臓細胞において、t-P A

の合成は、ホスホジエステラーゼ・インヒビターによって増加する(ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (Journal of Cell Biology), 91巻, 195~200頁, 1981年)。一方、cAMPは、マクロファージにおけるt-PA合成を阻害し(ヴァサリ(Vassalli)等、セル(cells), 8巻, 271~281頁, 1976年)、またテラトカルシノーマ細胞においては、不活性である(ニシムネ(Nishimune)等、エクスペリメンタル・セル・リサーチ (Experimental Cell Research) 146巻, 439~444頁, 1983年)。

酪酸は、テラトカルシノーマ細胞におけるt-PAの合成を誘導する(ニシムネ(Nishimune)、上と同じ)が、腎臓腫瘍細胞においては、阻害的効果を示し(ネルソン(Nelson)等、プロシーディング・イン・アメリカン・アソシエーション・フォー・キャンサー・リサーチ (Proc. Ann. Ass. for Cancer Research), 26巻35頁, 1985年)、また、ブルーティ・ボーイ(Brouty-Boye)等は、それが胎児肺細胞において、中性の効果をもつ事

を報告した(バイオテクノロジー(Biotechnology), 12巻10頁1984年)。

ヒトの内皮細胞におけるt-PA合成は、トロンビン(レビン(Levin)等、トロンボシス・アンド・ヘマトスタシス(Thrombosis and Hematostasis)56巻(2), 115~119頁(1986年)、アルコール(ローグ(Laug)、ジャマ(Jama)256巻(6)772~776頁1983年B)、ビタミンC及びビタミンA(イナダ(Inada)、等バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysical Communications)130巻(1), 182~187頁, 1985年)により、促進される。しかし、子ウシの内皮細胞におけるt-PAの分泌は、トロンビン(ロスクトフ(Loskutoff)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベストゲーション (Journal of Clinical Investigation), 64巻, 329~332頁, 1979年)及び内毒素(クルチレー(Crutchley)等、ジャーナル・オブ

・バイオリジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 261, 154-159, 1986年)により阻害される。

ブタの内皮細胞からのt-PA分泌は、ヘパリンによって、影響をうけるが(マークワード(Marckwardt)等、トロンボシス・リサーチ (Thrombosis Research), 8巻, 217~223頁1976年)、一方、ヒトの胎児肺細胞ではヘパリンは小さい効果しかもたない。

また、t-PAの合成には、胎児肺細胞(ブルーティ・ボーイ(Brouty-Boye)、上記)及び上皮細胞(エレクトリカラ(Electricwara)等、トロンボシス・アンド・ヘマトスタシス(Thrombosis and Hematostasis)53巻, 200~203頁, 1985年)におけるコンカナバリンA、上皮細胞(エレクトリカラ(Electricwara)等、上記)及びメラノーマ細胞(シラジ(Silagi)等、バイオリジカル・メディシン(Biological Medicine), 57巻, 418頁1984年)における、5-アサチジン、メラノーマ細胞におけるチザブリン

(ロバ(Roba)等、トロンボシス・アンド・ヘマトスタシス(Thrombosis and Hematostasis)50巻(1), 83頁1983年)及びヘパトーマ細胞におけるアフィジコリン(オーマノウダキス(Orfanoudakis)等、バイオリジカル・ケミストリー(Biological Chemistry)、ホプセーラー(Hoppe-Seyler), 336巻(9), 832頁1985年)がポジティブな影響を与える。

刊行されているヨーロッパ特許出願第0219270号では、ヘパリンと内皮細胞成長因子(EGF)を組合せると、無血清培地中の、正常なヒトの二倍体肺繊維芽細胞からのt-PA及び、一本鎖ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子の産生が増大すると報じている。

チャイニーズ・ハケスターの卵巣細胞における酪酸の影響が、ストーリー(Storrie)等(ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー (Journal of Cell Physiology), 94巻, 69~76頁, 1978年)及びライト(Wright)(エクスペリメンタル・セル・リサーチ (Experimental

Cell Research)、78巻、456~460頁、(1978年)によって報告されている。しかし、これらの研究は、トランスホームされていない細胞で行なわれており、またその結果は、細胞の形態や生育速度に大きく依存している。

本発明は、用いるタンパク質誘導物質が、チオグリコール酸、チオジグリコール酸、L-システイン、グルタチオン、臭化ブチリルコリン、塩化ブチリルコリン、ノナクチン酸、フラン脂肪酸、ススコルビン酸、アフィジコリン、6-ヒドロキシ-4, 6-ジメチル-3-ヘプテン-2-オン、フザリン酸、メバロン酸、トランスアンヒドロメバロン酸、アンヒドロメバロン酸ラクトン、シス-アンヒドロメバロン酸ラクトン又はD- α -ヒドロ置換(C₂又はC₃)脂肪酸モノ又はジカルボン酸もしくは、これらの塩であることを特徴とする、細胞培養物の中に、タンパク質の生産を誘導する物質を添加することにより、これらタンパク質の生産を増加させる方法に関するものである。

問題とするタンパク質としてはプラスミノーゲ

ン活性化因子、特に、t-P A及びその変異体が望ましい。しかし、本方法の効果は、タンパク質や、これらタンパク質をコードするDNAには依存せず、それゆえ、いかなる外来タンパク質をも発現するようトランスホームしたCHOに応用することができる。

変異体t-P Aは、天然のt-P Aの対応する部位のアミノ酸残基と異なるアミノ酸残基を1つ以上もつか、あるいは、天然のt-P Aの1つ以上のアミノ酸残基をもたない、t-P Aの誘導体である。この種の、いくつかのt-P A変異体は、文献、特に上記の特許出願、例えば、EP-A 199,574 及びDE-A 3708681に報じられている。

本発明の方法は、トランスホームしたCHO細胞に応用されることが望ましい。

また、C₂₂脂肪酸モノカルボン酸及びその塩は、トランスホームしたCHO細胞培養物において、t-P A及びその変異体の生産を向上することができることが分った。

好ましい、タンパク質生産促進物質には、チオ

グリコール酸、ノナクチン酸、酪酸及び、プロピオン酸がある。

このタンパク質生産促進物質は、市販されているものもあるし、文献から明白なものもあるし、場合によっては従来法で合成されたものもある。

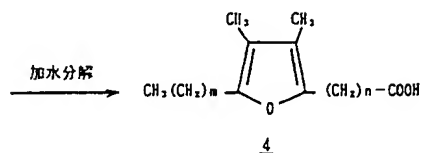
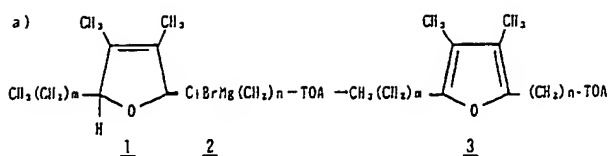
化合物、臭化及び塩化ブチリルコリン、フザリン酸、メバロン酸ラクトンは、市販されているもので、例えば、USA、ミズリー州、セントルイス、シグマ化学社から、入手できる。

ノナクチン酸及び、その合成法は、例えば、ヘルプ・ヒム・アクタ(Helv. Chim. Acta.)、XLV巻、(1962年)、No 15~16、129~138頁、テトラヘドロン(Tetrahedron)、36巻、No 1、46~49頁及び、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(J. Org. Chem.)、1980年、45巻、4259~4260頁に報告されている。

種々の文献、例えば、リピッド(Lipid)、1977年、12巻(10)、828~36、ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイアティー・

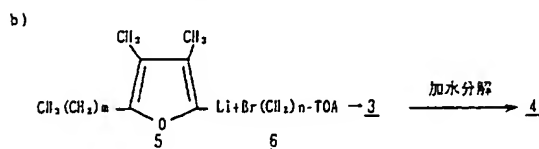
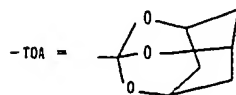
アンド・ケミカル・コミュニケーション(J. Chem. Soc. Chem. Commun.) 1976年)、(16)、630~631頁、リピッド(Lipids)、1975年、10(11)、695~702及びフエテ・セイフェン・アンストリッヒミテル(Fette ; Seifen, Anstrichmittel.)、No 8、1986年、290~292頁は、フラン脂肪酸について報告している。

この種の有用な酸も、次の図に従って反応を行ない合成することができる。



ここで $m = 2 \sim 5$ 、好ましくは 4、

$n = 4 \sim 12$ 、好ましくは 8 又は 10



エ・ビルダング・フォン 1, -アンヒドロマバロンザウアラクテン・ダルヒ・ヘルシーデン・ビルゼ (Die Bildung von 1, -Anhydromavalonsäurelacten durch verschiedene Pilze)。

化合物 6-ヒドロキシ-4, 6-ジメチル-3-ヘプテン-2-オンは、当分野での従来法により合成することができる。また、それは、天然物であり、C. A. 97:1595529、及びエイヨー・ト・ショクリョー1982年、35(2)、95~101頁で報じられているように、カピスカム・アナンヌ・バー・アングロサム (Capiscum annuus var angulosum) から単離することができる。また、この化合物は、ストレプトマイセスオリバセウス (Streptomyces olivaceus) の培養による合成 (Tu3082株、ブダベスト条約に従い、No. 4309として1987年11月23日、ジャーマン・コレクション・オブ・マイクロオーガニズムス (German Collection of Microorganisms) に登録された) とその単離と同様に、ゲッテンゲン大学のR. グローテ (Grote) によ

化合物 2 及び 6 の合成は、ボス (Voss) 等 (ヘルプ・ヒム・アクタ (Helv. Chim. Acta.), 1983年、66巻、2294頁に報じられている。

好ましくは $m = 4$ 、及び $n = 8$ 又は 10。

トランス-アンヒドロマバロン酸合成については、H. ディークマン (Dieckman) により報じられている (アーチブ・ファ・マイクロバイオロジー (Archiv für Mikrobiologie), 62巻、322~327頁 (1986年)、“ディエ・イソリエラング・ウンド・ダルステラング・フォン・トランス-5-ヒドロキシ-3-メチルペンタン-2-ザウア (Die Isolierung und Darstellung von trans-5-hydroxy-3-methyl-pentan-2-säure)”。化合物アンヒドロマバロン酸ラクトン及びシス-アンヒドロマバロン酸ラクトン及びその合成法については、ケダー (Keder) 等によって報じられている (バイオケム・ゼイツリフト (Biochem. Zeitschrift), 341巻、378~386 (1965年), ディ

り、“ネウエ・セクンダ・ルストフェ・アウス・ストレプトミセステン (Neue Sekundärstoffe aus Streptomyces)”; イソリエラング・ウンド・ストラクタル・オウフクララング・デル・コラボミシン, ピロラメ・ウンド・デス・ピリダゾミシンス (Isolierung und Strukturaufklärung der Colabomycine, Pyrrolame und des Pyridazomycins)” という論文に報じられている。それは次に示すようなNMRスペクトルをもつ。

$C_8H_{14}O_2$ (156.23)

EI-MS: $m/e = 138$ ($M^+ - H_2O$;

高分解能, $C_8H_{14}O_2$, 6%);

123 ($M^+ - CH_3O$, 8%);

98 (高分解能, $C_8H_{14}O_2$, 48%);

83 (100%)

^1H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 1.27$ (s, 7-H; u, 8-H);

1.43 (s, ブロード, $HO.MeOD$ と交換);

2.21 (s, 1-H);

2.35 (d, $J = 1.3$ Hz, 9-H);

2.32 (s, broad, 5-H);

6.13 (s, broad, 3-H) ppm

$^{13}C-NMR$ (50.3 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 22.0$ (o, C-9);

30.0 (o, 2C, C-7 u, C-8);

32.0 (o, C-1); 54.4 (u, C-5);

71.1 (u, C-6), 127.2 (o, C-3);

155.1 (u, C-4);

198.6 (u, C-2) ppm

タンパク質生産を増加する物質は、培養の3日目の終わりまでの、培養の期間、例えば0日目、すなわち、培養の開始時に添加する。

また、タンパク質生産を増加する物質は、何回か適用することもある。つまり、細胞を、その物質の存在下で培養し、培地からその細胞を取り出してから、新しい培養培地に移し、タンパク質生産を増加する物質の存在下培養する。この多重適用においては、特に、 C_{12} 、脂肪酸モノカルボン酸又はその塩、好ましくは、酪酸及びチオグリコール酸又はそれらの塩が、促進効果を示す。

多重適用を行う場合、すべての適用に同じ物質を使う必要はなく、むしろ、1つの適用に対して1つの物質が、別の適用には、別の物質が使われる。また、この多重適用は、特に、1つの適用にアフィコリンを用い、別の適用に他の物質、例えば、酪酸、プロピオン酸、塩化ブチルコリン又は臭化ブチルコリンあるいはそれらの塩を使用する時などに見られるように、促進効果を示す。

2つ以上の物質を組合せて使用することもでき

指定した酸の塩の例としては、特にアルカリ金属塩、好ましくは、ナトリウム及びカリウム塩があげられる。

本発明の方法は、血清含有培地、又好ましくは、無血清培地で行なわれる。

もし、本法が血清含有培地で行なわれる場合は、例えばチオグリコール酸、ノナクチン酸又はフラン脂肪酸あるいはそれらの塩を使用するのが好ましい。

もし、本法を無血清培地で行う場合は、 C_{12} 、脂肪酸モノカルボン酸、さらに好ましくは、酪酸又はプロピオン酸もしくはそれらの塩を用いるのが望ましい。

タンパク質の生産を増加する化合物は10 μM から500 mM、例えば、1 mMから1 mMの濃度でその効果を示すことが分っている。 (C_{12}) 、脂肪酸モノカルボン酸、チオグリコール酸、チオジグリコール酸、L-システイン及びグルタチオンもしくはその塩が特に、1 mMから10 mMの範囲で効果的である。

できれば、細胞の生育を阻害する物質は、一つも使わない事が望ましい。たとえば、 C_{12} 、脂肪酸モノカルボン酸、好ましくは、酪酸及びチオグリコール酸もしくはそれらの塩を使用し、第2の物質としてモノカルボン酸又はその塩を細胞培養物に添加するのが好ましい。

トランスホームしたチャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞とは、培養により、望ましいタンパク質を合成及び発現できる、それらタンパク質をコードするベクターでトランスホームしたCHO細胞である。

例えば、使用したトランスホームしたチャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞は、ヨーロッパ特許出願第 0093619号及び第 0199574及びドイツ特許出願第 3708681号に報告されている細胞がある。これらトランスホームしたCHO細胞を培養することにより、E-P-A (E-P-A 0093619)及びあるE-P-A変異株 (E-P-A 0199574 及び D-E-A 3708681) を合成することができる。

ベクターでトランスホームしたCHO細胞で、

他のタンパク質を発現する細胞が、ここで参照しているヨーロッパ及びドイツ特許出願等の文献で知られる方法によって作られている。

使用する宿主細胞には、バック (Puck) によって、1957年生検物質から単離された、CHO-K1という名で知られる細胞があり、1970年、CCL-61という名で、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (ATCC) に保管された。この細胞系列は、ブダベスト条約に従いが、CRL 9618という番号で、1987年12月23日、ATCCに保管された。

望ましいタンパク質をコードするDNA配列を、例えば、先に述べた特許出願のような、文献に見られる方法によって調製することができる。この配列と、同時に制御配列を含むベクターを、例えば、ブダベスト条約に従いが、53704号及び53705号として、1987年12月23日にATCCに再登録した、大腸菌k12294 (ATCC 31446) 及び大腸菌X1776 (ATCC 31537) を用い、

従来から知られている方法により構築することができる。これらベクターの例には、EP-A 093619で報告されている、プラスミドpETPER及びpETPFRが含まれる。CHO細胞は、EP-A 093619、DP-A 370868、EP-A 0117059 及びEP-A 199574又は文献から知られる他の方法によって、トランスホームされる。

t-P A生産のためのベクターをサブクローン、CHO-k1-DUXB11 (アラウブ (Urlaub) 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proceedings of National Academy of Science), U.S.A., 77巻、4216~4220頁1980年) に組込む。この細胞系列、ジヒドロホレート・リダクターゼ・マイナス変異株 (DHFR-) は、そのトランスホームした細胞クローンのDHFR依存の選択に通している。ヒトのcDNAに対するベクターには、よく知られているプラスミドベクターpBR322又はその大腸菌誘導体がある。問題としている遺伝子及び、DHFR遺伝子のプロモーター

領域はSV40由来のものであり、また両遺伝子の停止領域は、ヘパティティスB表面抗原由来のものである。例の中に、プラスミドpETPER又はpEPEFR (EP-A 0117059 参照) によってトランスホームしたCHO-k1-DUXB11細胞が使われている。

無血清培地として、種々の製品を使用することができる (例えば、BMFT-ステータス・セミナー (BMFT-Status Seminar) 12 (1985年、11月13日)、フェデラル・ミニストリー・オブ・リサーチ・アンド・テクノロジー (Federal Ministry of Research and Technology), 5300ボン (Bonn) 2, 111~120頁)。次に示す例では、新しく開封した、DMEM/Ham's F12培地 (1:1) (ギブコ製 (Gibco)) を無血清培地として用いた。添加物として、胎児のウシ血清 (FCS) を、7.5%又は1~2%の濃度で使用する。

この細胞培養物を、ヘリウス (Hereaus) インキュベーター中、37℃でインキュベートし、相対湿

度100%の、7.5%CO₂を含む、二酸化炭素と空気の混合物を供給する。そのパッチにより、異なる培養器を使用した: 100~1000 ml培地には、スピナーベセル、175cl (70~100 ml培地)、75cl (30~50 ml培地)、25cl (7~10 ml培地) のロックス (Roux) 皿 (ナンク (Nunc)) 及び1 ml培養物に対しては、2clのコスター (Costar) で作った多重培養皿等。この株を維持するため、この細胞は、

0.2~0.3×10⁵ 個/mlの密度で使用し、2~3日毎サブクローンした。

タンパク質生産を促進する物質を、種々の段階で、100分の1希釈となるよう添加した。すなわち、まず、それらを、まず培地で溶かすか、もし、それらが容易に溶けない場合は、一度エタノールに溶かし、それから培地に加え、ついで、この物質を含む培地を、1:100 v/vの比で、細胞含有培地に添加する。

次に示す例では、t-P Aの合成を促進するため、対数増殖期の細胞をベックマンT₆遠心機

で、 $1000 \times g \cdot 10$ 分間、プラスチック試験管（ファルコン製）を用いて遠心した。上清をデカンテーション後、細胞ペレットを、新鮮培地に再懸濁する。

血清含有培地における t-P A 生産には、新鮮培地に、F12 / DMEM + 7.5 % FCS + ゲンタマイシンを用いた。その懸濁液を 2 ml の 24 穴ディッシュに、 $0.2 \sim 0.3 \times 10^5$ 細胞 / ml となるように調製した。

無血清培地での t-P A 生産には、その細胞をまず、1 ~ 2 % ウシ胎児血清培地中、3 ~ 4 日間処理し、再び遠心後、その細胞ペレットを、無血清培地に再懸濁し、その後、細胞密度が $0.4 \sim 0.5 \times 10^5$ 細胞 / ml となるよう、2 ml 24 穴ディッシュに移した。

(定量的 t-P A の測定)

細胞上清及び細胞抽出物の部分標本を種々の時間に取り出すか、もしくは調整する。この試料を直ちに、もしくは、 -20°C での保存の後、次の方法に従って測定する。

(2-イライザ法)

イライザ法（酵素結合免疫吸着検定法）を用い、上清及び細胞抽出物の t-P A 試料を定量的に測定した。用いた標準物質は、 $0.038 \sim 5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の一連の濃度の研究室標準物質である。試料はあらかじめ 1 : 10 から 1 : 1000 に希釈した。

(トランスホームした CHO 細胞の特徴)

(細胞の増殖)

培養皿（7.5 % FCS を含む）中に $0.2 \sim 0.3 \times 10^5$ 細胞 / ml となるよう CHO 細胞を接種すると、最初は非常にゆっくりと複製が起こる。24 時間継続するラグタイムの後、対数増殖期が始まる。 $1.3 \pm 0.04 \times 10^5$ 細胞 / ml の細胞密度となる 4 日目に培養液中に、最初の死細胞が出現する。全細胞数のうち、それら細胞の割合は、 $1.3.2 \pm 1.3\%$ であった。最高細胞密度は、5 日目に、 $1.8 \pm 0.05 \times 10^5$ 細胞 / ml に到達する。

生細胞の数は、7 日目には、まだ全細胞量の

(測定法)

(1. 直接的比色検定 (DCA))

p-ニトロアニリンを、t-P A を用い、メスルス・カビ・ディアグノスチカ (Messrs, Kabi-Diagnostica) の合成ペプチド基質 s-2288

(D-H-Ile-Pro-Arg-P-ニトロアニリン) 由来の反応産物として作る。t-P A の活性は、 37°C 、 405nm で測定される、p-ニトロアニリンの生成に比例する。

この酵素の速度論的分光学的測定は、メスルス・エッペンドルフ (Messrs, Eppendorf) 製の ACP-5010 分析機を用い、自動的に行うことができる。

この酵素の活性は、標準物質を用いて計算した。 $1 \sim 15 \mu\text{g} / \text{ml}$ の一連の t-P A 標準物質を、72 % の一本鎖物質を含む研究室標準物質を用いて調製した。

基質溶液 (100mM トリス / 106mM NaCl) は、 50mM 濃度で使用した。

$72 \pm 3\%$ 存在する。

指数的細胞増殖につづいて、静止期が種々の要因により始まる。高密度と、基本的栄養の消費の結果、細胞はもはや分裂できない。静止期の期間は、かなりまちまちであり、血清のような培地成分に依存する。酸及び毒性の代謝産物の蓄積と、培地の因子の変化も細胞を死滅させる。

(CHO 細胞における t-P A の生産)

細胞増殖と、t-P A 合成には直線関係がある。

経時的 t-P A 生産のパターンは、2 つの相を示す。第 1 の相では、上清中の t-P A 濃度は、一定に増加する。第 2 の相では、酵素合成は事実上停止し、培地中の t-P A 濃度は、実質的に一定に維持される (図 2 A)。イライザ法によると、最高の t-P A 濃度は、4 日目で $1.1 \pm 0.7 \mu\text{g} / \text{ml}$ であった。測定した t-P A 濃度は、比色検定ではいくぶん高い値を示したが、これは、2 本鎖 t-P A に寄因するものらしく、イライザ法と比べると、4 日目まで、両検出法の曲線は平行線をたどる。

また細胞内 α -P Aも、細胞増殖と平行しており、また、それは、合成された全 α -P A量と比較すると非常に低い値を示す4日目までの割合は、全活性の7%であった(図7B)。

図3Aにみられるように、 α -P A合成は細胞増殖に基づいて、4日目までゆっくりと増加する。イライザ法によると、 1×10^4 細胞当り最高 $1.8 \pm 1.2 \mu\text{g}$ の α -P Aが検出された。細胞に結合した α -P Aは、これらの α -P A濃度が低すぎて($1 \mu\text{g}$ 以下)、DCAでは測定できないため、イライザ法のみで測定した。

細胞数に基づく、細胞内 α -P A含量は、細胞増殖の対数期には、いくぶん高く、 1×10^4 細胞当り、 $500 \sim 900 \text{ ng}$ の値を示し、4日目から、その α -P A値は、 1×10^4 細胞当り約 450 ng となった(図3B)。

(細胞増殖における培地中の血清及び血清因子の影響と、CHO細胞における α -P A生産)

培地中の血清濃度を、いろいろ変化させ、 0.25×10^4 細胞/ ml に細胞液を調整した。

培地中5%以下の血清濃度は、細胞分裂に影響しないが、生産にはわずかな影響を与えた。

細胞の48時間インキュベーション後の、細胞増殖及び α -P A生産への、培地中の血清濃度の影響を、表1に示した。値は、最高値に対する割合で示してある(培地中7.5%FCS)。細胞数の最高値は $0.56 \pm 0.03 \times 10^4$ 個であり、 α -P A濃度の最高値は $5.7 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。 α -P Aの測定は、DCAによって行った(平均 \pm SE、 $n=4$)。

表 1

% FCS	細胞数	α -P A
40	61.5 ± 2.8	59.2 ± 3.9
20	79.4 ± 3.8	81.2 ± 2.4
10	88.6 ± 5.3	90.3 ± 6.7
7.5	100.0 ± 6.4	100.0 ± 7.9
5	72.4 ± 4.9	87.0 ± 11.3
1	43.1 ± 1.5	79.2 ± 6.7
0	37.5 ± 1.8	75.4 ± 4.6

(無血清培地における細胞培養)

無血清培地に、 $0.4 \sim 0.5 \times 10^4$ 細胞/ ml となるよう細胞液を調整した。4日目まで細胞は分裂を繰り返し、生細胞の最高値も4日目に $1.0 \pm 0.2 \times 10^4$ 細胞/ ml に到達した(図4)。

(無血清培地における α -P A生産)

上清中の α -P A濃度は、7日目まで一定して増加し、イライザ法によると、最高 $13.6 \pm 0.54 \mu\text{g}/\text{ml}$ に到達した。DCAで測定した α -P A値は、1日目から3日目まで、イライザ法による α -P A値よりも低かったが、4日目からは、その値よりも高くなった(図5)。

無血清培地における細胞当りの α -P A合成は、血清含有培地とほぼ同様であり、 7.2 ± 3.6 と 10.3 ± 2.8 ($\mu\text{g}/1 \times 10^4$ 細胞)の間の値となった(イライザ法)(図6)。

上清中の全タンパク質量に基づく、無血清培地中の α -P Aの割合は、 10.9 ± 1.0 と 12.5 ± 1.4 (%)の間であった。その結果を表2に示す。 α -P A値はイライザ法で測定した

(平均 \pm SE、 $n=4$)。

表 2

日	タンパク質($\mu\text{g}/1 \times 10^4$ 細胞)	α -P A($\mu\text{g}/1 \times 10^4$ 細胞)
1	71.0 ± 8.0	7.2 ± 3.6
3	81.8 ± 9.4	9.0 ± 2.3
5	82.0 ± 12.2	9.3 ± 0.8

(脂肪酸モノカルボン酸の効果)

種々の脂肪酸モノカルボン酸に対する、7.5%FCS含有培地におけるCHO細胞の α -P A生産の増加を表3に示した。全ての酸は、 10 mM から 500 mM の範囲で使用した。全てのモノカルボン酸に対して、最適な投与範囲は、1から 10 mM の範囲であった。その酸の効果は、鎖の長さに依存する。

全ての効果的なモノカルボン酸は、細胞増殖を阻害する。プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸及びイ

ソ吉草酸は、細胞増殖の阻害をもたらす一次代謝の濃度依存的阻害が、 ϵ -PA合成の増加と一致するので、広い濃度範囲で有効であった。

表3に示した値は、 1 ml の細胞上清についてのもので、コントロール(0%)と比較して、%で与えられている。 ϵ -PAはDCAで測定した(平均 \pm SE、 $n=3\sim 24$)。最高値は個々の試料についてのものである。独特の試料のデータをカッコ内に示した。

表 3				
モノカルボン酸	最適投与範囲	ϵ -PA合成の増加(%)		
		最高	平均	
ギ酸	100 μM	7.4	6.5 \pm 0.9	
プロピオン酸	5-10mM (10mM)	45.5	28.0 \pm 2.5	
酪酸	1-5mM (1mM)	68.3	41.9 \pm 3.8	
イソ酪酸	0.6-10mM (10mM)	32.9	16.6 \pm 2.8	
イソ吉草酸	1-20mM (5mM)	39.3	18.7 \pm 2.4	

24.8 \pm 0.5%(C₃)の ϵ -PA生産の増加を検出することができる。イソ酪酸の場合、48時間が経過するまで、生産の増加はない。 ϵ -PA生産の最高の増加は、3日目の、C₃及びC₄カルボン酸の使用時に認められ、酪酸ナトリウムで、37.2 \pm 5.1%に及んだ。生産の増加は、酪酸及びイソ酪酸の場合、短期間であり、4日目の増加はもはや認められない。一方、プロピオン酸及びイソ吉草酸の増加効果は、4日目にもあり、また、それ自身、C₃に対しては、31.8%及びC₄に対しては8.5%の ϵ -PA生産の増加を示した。また、その効果は、細胞の生理状態に依存している。その細胞は、対数増殖期の間、刺激に対し、非常に敏感である。

表4は、C₃、モノカルボン酸によるFCS 7.5%含有培地におけるCHO細胞の ϵ -PA生産増加の、カルボン酸適用日依存性を示し、7.5%FCS含有培地で、その細胞が48時間生育していることを表わしている。酪酸及びイソ吉草酸の濃度は1mM、プロピオン酸とイソ吉草酸の場

平均値は、表3Aに示すように、モノカルボン酸を培養の0日目から3日目に添加した、3~4日つづけた何回かの生産実験から得たものである。独特の試料のデータを、カッコ内に示してある。

表 3 A			
モノカルボン酸	添加日	サンプリング日	n
ギ酸	10(0)	2-3(2)	4
プロピオン酸	0-3(2)	1-4(3)	24
酪酸	1(3)	2-4(3)	18
イソ酪酸	0-2(3)	2-4(3)	11
イソ吉草酸	0-2(4)	1-4(4)	19

nは、生産実験数。

図7は、C₃、モノカルボン酸によってもたらされた、7.5%FCSを含む培地中での、 ϵ -PA生産増加の時間曲線を示している。24時間後、すでに、18.1 \pm 5.7%(C₄)から、

合は、5mMを使用した。その値は、細胞上清1mlについてのものであり、コントロール(0%)と比較した%値で示してある(平均 \pm SE、 $n=3\sim 5$)。 ϵ -PAはDCAにより測定した。

表 4				
適用日	C ₃	C ₄	C ₄	C ₃
0	28.7 \pm 9.3	33.0 \pm 5.4	20.1 \pm 10.7	17.2 \pm 1.0
1	24.4 \pm 4.1	40.2 \pm 12.2	25.3 \pm 5.1	19.4 \pm 1.5

(CHO細胞における ϵ -PA生産に対する酪酸の効果)

その促進効果は、細胞内 ϵ -PA濃度かつ、細胞外 ϵ -PA濃度の増加として検知される。

図8から明らかなように、酪酸処理した培養物中の細胞内 ϵ -PA含量の増加は、コントロールと比べ、24時間インキュベーション後に最大と

なる ($43.8 \pm 9.8\%$)。上清における増加の割合は、24時間後、コントロール値と比べて平均 19.2% (DCA及びイライザ法) といくぶん低い。この効果は、上清において、72時間継続する。

図9A-Cは、t-PAの合成が細胞数に依存しており、また、酪酸ナトリウムによるt-PA合成の促進は、細胞増殖の阻害にもかかわらず、7日間以上も継続することを示している。始めの4日間、細胞当りの酵素合成は、一定に増加する。上清においては、t-PA濃度は、 1×10^6 細胞当り、 $7.5 \pm 1.1 \mu\text{g}$ から $28.9 \pm 5.3 \mu\text{g}$ t-PAへと増加する (イライザ法) (図8A)。

DCA法を用いて、 1×10^6 細胞当り、 $47.4 \pm 7.4 \mu\text{g}$ t-PAの最高t-PA含量が測定された (図9B)。同時に、細胞内t-PA含量は増加し、また5日目には、 1×10^6 細胞当り $1.5 \pm 0.2 \mu\text{g}$ t-PAから低下している (図9C)。

表5は、7.5% FCS含有培地での酪酸による

t-PA合成の促進%、細胞数に基づくものであることを示している。酪酸ナトリウムは、0日目に、1 mM濃度となるよう添加した。1~4日目の値は、コントロール (0%) と比較した%で表示しており、 1×10^6 個細胞の値である。上清及び細胞抽出物中のt-PA含量は、イライザ法で測定した (平均 \pm SE, $n = 5 \sim 10$)。

表 5
日 細胞内 細胞外

1	90.9 ± 9.5	68.5 ± 12.4
2	99.7 ± 26.3	118.8 ± 16.1
3	93.9 ± 31.4	223.4 ± 77.4
4	209.8 ± 41.4	280.7 ± 85.9

生産の最高の増加は、酪酸ナトリウムを、対数増殖期の細胞に加えた時達成された。通常、酪酸ナトリウムの最高の効果は、0日から2日間まで

の適用間隔を設けたときの、第3日目に現れる (図10)。

同じ細胞集団において、培地を交換後、3~3日毎に酪酸ナトリウムを適用することにより、非常に長い間、高いレベルのt-PA生産を維持することができる。

表6は、7.5% FCS含有培地で培養したCHO細胞でのt-PA生産の増加を示している。1 mMの酪酸ナトリウムは、培地を交換する度か、もしくは0日目のみ添加した。培地交換後、各々2、4、7、又は9日目の値を、コントロール (0%) と比べた%値で示した。又、この値は、1 mLの細胞上清についての値である。t-PA測定はDCAで行った (平均 \pm SE, $n = 3$)。

表 6
培地交換日 適用日、0.2.4.7

2	33.0 ± 5.4
4	107.4 ± 7.6
7	96.6 ± 5.8
9	62.0 ± 4.8

(無血清培地中のCHO細胞におけるt-PA生産に関する酪酸の影響)

血清含有培地における酪酸塩処理によるt-PA合成増加が短時間だったのに比べて、無血清培地での効果はより長く続き、酪酸ナトリウム適用から1日後には、コントロールと比べ $44.1 \pm 7.1\%$ となった。最高の増加は、酪酸ナトリウム適用後3日目に、 $143.3 \pm 12.8\%$ という値で達成された。増加効果は、酪酸ナトリウム適用後6日目にも、 $49.9 \pm 7.0\%$ という値で検出された (図11及び12)。

1×10^4 個の細胞に基づく、 t -P A 合成は、血清含有培地よりも、無血清培地の方がより大きく、 1×10^4 細胞当たり、約 $50 \mu g$ にまで達した (図 13)。

(プロビオン酸の効果)

C₃-カルボン酸の t -P A 合成に関する効果は、酪酸のものと同一である。しかし、増加の割合は、約 14% 少なく、また t -P A 合成を促進するのに、より高い濃度を必要とした ($5 \sim 10$ mM)。さらに、プロビオン酸は、細胞増殖の阻害効果はより小さく、それゆえ、 t -P A 合成の増加は、より長い時間継続される。

プロビオン酸による t -P A 合成の促進は、無血清培地中では、コントロールに比べ、細胞外タンパク質含有はわずかに増加したのみであり、また、(3H) ロイシンの取込みもわずかに増加するのみであることから、酪酸とは対照的に、非常に特異的であるようだ。

ラン脂肪酸などの長鎖脂肪酸も、その増加を引き起こすことが分った (表 7)。この例では、式 4 に従うフラン脂肪酸は $m = 4$ から $n = 8$ のものを使用した。

しかし、無血清培地では、 t -P A 合成、あるいは、タンパク質合成の増加の証拠は得られなかった。

長鎖脂肪酸によって引き起こされた CHO 細胞における、 t -P A 生産の増加は、表 8 に示した。細胞は、7.5% FCS を含む培地で培養した。酸は、 $10 \mu M$ から 10 mM の範囲の濃度 (最適濃度は 1 mM) でテストした。その値は、 1 ml の細胞上清のものであり、コントロール値 (0%) と比べた % で示されている (平均 \pm SE, $n = 4 \sim 9$)。最高値は、個々の試料について出したものである。 t -P A は、DCA で測定した。

(ジカルボン酸、ヒドロキシカルボン酸及びケトカルボン酸の、CHO 細胞における t -P A 生産への効果)

乳酸、グリセリン酸、リンゴ酸及び酒石酸などのヒドロキシカルボン酸は、 t -P A 合成で、6% \sim 10% の間の、わずかな増加のみを示したが、 10 mM の濃度の酒石酸は、 t -P A 合成を最もよく促進した (コントロールと比べて、 $10.3 \pm 2.9\%$)。細胞分裂は、ヒドロキシカルボン酸によって影響をうけず、また、 t -P A 合成への効果は、96 時間後もなお検出することができた。

(アスコルビン酸の効果)

10 mM 濃度のアスコルビン酸の、 t -P A 生産への効果は、72 時間も続き、また、0 日目に適用した時、24 時間後に、 t -P A 合成を $15.2 \pm 3.1\%$ 増加させた (図 14)。

(長鎖脂肪酸の、CHO 細胞における t -P A 生産への効果)

10 個の炭素元素をもつ、ノナクテン酸や、フ

表 7

脂 肪 酸	t -P A 合成の増加 % 最高値	平均値
ノナクテン酸	58.3	30.3 ± 6.5
フラン脂肪酸	32.1	19.0 ± 3.2

平均値は 4 日間の実験を何回か行って出したものであり、また、酸は、表 8 に示したように、0 日目に添加した。独特の試料のデータを、カッコ内に示した。

表 7 A

脂 肪 酸	添加日	採取日	n
ノナクテン酸	0 (0)	1-4 (2)	4
フラン脂肪酸	0 (0)	1-4 (2)	9

(CHO細胞中のt-PA生産への、チオールとスルフィドの効果)。

カルボン酸の置換産物又は誘導体である含硫化合物は、細胞増殖に負の効果を与えることなく、t-PA生産を16から31.2%増加させる(表8)。置換カルボン酸は、他の活性カルボン酸と同濃度範囲(1~10mM)で最適活性を示した。グルタチオンのみは、1~10μMの低濃度でも効果的であった。チオグリコール酸は、CHO細胞におけるt-PA合成に好ましい促進剤であることが分った。

この例においては、細胞を、7.5%FCSを含む培地で培養した。全ての物質は、1μMから10mMの濃度範囲でテストした。表9に示した値は、1mlの細胞上清についてのもので、コントロール(0%)と比べた%値で表わされている(平均値±SE, n=6~19)。

最高値は、各試料についてのもので、t-PA測定は、DCAで行った。基質濃度をカッコ内に示した。

表 8 A

チオール及び スルフィド	添加日	採取日	n
チオグリコール酸	0-2(1)	1-3(2)	19
チオグリコール酸	1(1)	2-3(3)	9
システイン	0-1(0)	1-3(2)	11
グルタチオン	0(0)	2-3(2)	6

モノカルボン酸に対する、チオカルボン酸の利点は、細胞増殖に関する阻害効果がないことであるが、t-PAの生産は、酪酸に比べて、これらの物質によって、増加するということはない。増加効果がある期間も短かく、チオグリコール酸に対しては24時間後、システインに対しては48時間後までその最高値が維持される。細胞インキュベーション4日後、t-PA生産への効果はなお小さい(図15)。

表 8

チオール及び スルフィド	最適投与 範囲	t-PA合成の増加% 最高値	平均値
チオグリコール酸	1mM	66.4	31.2±3.2
チオグリコール酸	1mM	31.0	18.0±3.8
システイン	1-10 mM(1mM)	41.4	20.9±3.4
グルタチオン	1-10 μM(10 μM)	30.6	16.0±2.0

平均値は、3日間の、いくつかの生産実験についてのもので、その物質は、表8Aに示されているように、0日から2日目に添加された。独特の試料のデータを、カッコ内に示した。

しかし、無血清培地では、t-PA合成に関する促進効果は、全ての物質が10%から20%、細胞分裂を阻害することから、血清含有培地中ほど大きくなる。

(チオグリコール酸の効果)

チオグリコール酸による処理後72時間、t-PA生産は増加し、それは、適用の日に依存しない。酵素合成の増加率は、24時間に最高となり、それから徐々に低下する。

表9は、適用する日に応じて、7.5%FCS及び1mMチオグリコール酸を含む培地中、24から96時間培養したCHO細胞におけるt-PA生産が増加することを示している。その値は、1mlの細胞上清についてのもので、コントロール(0%)と比べた%で表わされる(平均±SE, n=4~6)。t-PAはDCAで測定した。

表 9
時間(h) 通 用 日

	0	1	2
24	27.6±5.6	34.7±10.9	34.5±7.5
48	16.9±2.3	17.1± 3.6	16.3±8.6
72	14.7±1.0	10.2± 2.7	9.4±1.7
96	3.4±1.0	2.7± 0.8	0.5±1.0

l-P A 生産は1回ではなく、2回のチオグリコール酸の適用により増加される(図16)。

図17A(DCA)及び図17B(イライザ)において、l-P A合成曲線は、 1×10^4 個の細胞に基づいて示した。l-P A合成は、最初の3日間、1 mMのチオグリコール酸により、コントロールに比べ増加した(DCA)。一方、イライザ法で測定したl-P A値は全期間にわたり増加した。4日目で、その増加率はなお約35%で

表10は、2つの先に示したモノカルボン酸誘導体によって達成される、CHO細胞におけるl-P A生産の増加を示している。細胞は、7.5% FCS含有培地で培養した。全ての物質は10 μ Mから10 mMの濃度範囲でテストした。その値は、コントロール(0%)に対する%値で示され、これらの値は、1 mlの細胞上清についてのものである(平均±S.E., n=4~15)。独特の試料に関する値をカッコ内に示した。l-P Aは、DCAによって測定した。

表 10

モノカルボン酸 誘導体	最適投与 範囲	l-PA 合成の増加(%) 最高値	平均	n
B C C	5-10mM(10mM)	63.9	38.8 ± 4.4	15
B C B	5-10mM(2.5mM)	49.6	29.1 ± 4.4	9

あった。また、細胞当りの細胞内l-P A含量も、チオグリコール酸により増加する。細胞内l-P A濃度の最適値は、24時間後の $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g} / 1 \times 10^4$ 細胞であり、また96時間以内に、元の濃度の半分に低下する(図17C)。

細胞外l-P A濃度は、5日目に、コントロールに比べ10.7%増加した。チオグリコール酸によるl-P A合成の増加率は、細胞分裂を若干阻害する(10-20%)ことから、無血清培地において、いくぶん低くなる。

(CHO細胞におけるl-P A生産に関する、モノカルボン酸の誘導体の効果)

C. カルボン酸誘導体のグループのうち、CHO細胞におけるl-P A合成への効果をもつ、他の物質がみついている。これらの物質には、まず、臭化及び塩化ブチリルコリン(BCB及びBCC)が含まれ、これらは、30から40%のl-P A生産を増加する。これらC. 誘導体は、全ての点で、酪酸ナトリウムと同様の効果を示し、同濃度で効果を示した。

平均値は、表10Aに示したように、いくつかの4日間生産試験についてのものである。独特の試料の値をカッコ内に示した。

表 10 A

物 質	添加日	採 取 日	n
BCC	1 (1)	2~4 (4)	15
BCB	1 (1)	2~4 (4)	9

(異なるl-P A合成促進剤を合せたときの効果)

物質を組合せて用いるとき、少なくとも1つの物質は、細胞増殖を阻害しない性質のものでなければならない。

例えば、チオグリコール酸と酪酸を組合せて、収量の増加が成し遂げられる。個々の物質の適用間隔が重要な役割を果たし、例えば酪酸は、細胞増殖の阻害効果を軽減するために常に第2の物質

として添加される。

それらの物質が0日目に同時に投与されても、
酪酸の効果は増加しない。

その効果は、酪酸とチオグリコール酸の組合せ
に対し、累積的である。最高増加値70%が達成
された。

無血清培地においては、酪酸の効果は、他の物
質の添加により、さらに増加することはない。

7.5% FCSを含む培地中で、3日間培養した
CHO細胞におけるt-PA生産の増加を表11
に示した。種々の時間に、1mMチオグリコール
酸(TG)及び1mM酪酸を組合せて、細胞に投
与した。その値は、1mlの細胞上清についてのも
のであり、コントロール(0%)に対する%値で
表わされる(平均±SE, n=4~8)。

t-PAはDCAで測定した。

成を促進することが分った。それは可逆的にDNA
合成を阻害するが、RNA及びタンパク質合成に
は、影響しない。したがって、アフィジコリンは、
一方ではt-PA合成の促進に通しているが、一
方では、細胞を同調させるのに通している。細胞
をアフィジコリンを含む培地中で、かなり長い時
間インキュベーションしたとき、t-PA合成に
関するアフィジコリンの効果は、先に述べた。こ
の出来事は、24時間、アフィジコリンにさらに、
ついてアフィジコリンを含まない培地中で培養し
たCHO細胞を用いた研究に関するものである。
DNA合成の阻害及び、アフィジコリン除去後の
合成の回復をモニターするため、細胞周期の相及
び24時間ラベリングの間及びその後の[³H]
チミジンの取込みを分析した。さらに、RNA、
タンパク質及びt-PA合成を測定した。

(細胞増殖)

細胞増殖はアフィジコリンによる24時間の処
理後、わずかに阻害された(5~10%)。しか
し、培地交換の時、アフィジコリン処理培養物は、

表 11

適用日			
TG	酪 酸		
	0	1	2
0	31.3±1.7	67.9±5.2	30.3±3.2
1		68.8±4.4	31.4±5.5
2			41.4±5.5

(アフィジコリンの効果)

セファロスポリウム、アフィディコラ

(*Cephalosporium aphidicola*) 由来のジテルベ
ン、アフィジコリンは、特異的にDNA・アルフ
ァ・ポリメラーゼを阻害し、1~10μMの濃度
で、CHO細胞中のt-PA合成を促進する。

24時間後、t-PAの収率は、44.9±13.9
%増加した。

アフィジコリンは、CHO細胞中のt-PA合

コントロール培養物と同じ細胞数に戻した。

(t-PA合成)

t-PA合成は、1μMアフィジコリン同調細
胞で促進された。その効果は、培地交換後96時
間までも確認された。

7.5% FCS含有培地で培養した1mMアフィ
ジコリン処理CHO細胞におけるt-PA生産の
増加を表12に示した。この値は1mlの細胞上清
についてのもので、コントロール(0%)に対す
る%値で表わされている(平均±SE, n=4)。
t-PAはDCAを用いて測定した。

表 12

時間(培養交換後の時間)	t-PA合成の増加%
24	40.2±6.7
48	59.9±11.1
72	32.8±6.4
96	14.7±1.3

表 13

時間 (培地交換後の時間)	t-PA合成の増加%
96	36.7 ± 6.2
120	42.0 ± 8.2
144	51.3 ± 10.2

図18は、無血清培地におけるt-PA合成増加の時間曲線を示している。その効果は、培地交換後48時間目に最高値に達した。

無血清培地におけるt-PA濃度は、イライザ法を用いて、96、120及び144時間後に測定され、一方、コントロール値と比べて得られた、この値は、実質的にDCAで測定された値よりも高かった。その結果を表13に示した。テストは、無血清培地で培養した、1μMアフィジコリン処理CHO細胞で行った。その値は、1mlの細胞上清についてのものであり、また、それは、コントロール(0%)に対する%値で示されている(平均±SE, n=4)。t-PAはイライザ法で測定した。

細胞内t-PA濃度の増加は、アフィジコリンとの24時間インキュベーションの間に観測され、それは、約30%増加した。

酪酸、プロピオン酸、塩化及び臭化ブチリル・コリンは、このシステム中でなおt-PA生産を増加することができる。この促進は、無血清培地及び高血清培地の両方で成功した一方、細胞、を無血清培地条件に24時間適用した後に、この物質を適用したとき、さらに増加効果が達成された。

表14は、酪酸ナトリウム適用後、アフィジコリン処理培養物におけるt-PA生産の増加率を

示している。96時間後、酪酸ナトリウムは、t-PA合成をさらに14%増加させる。

テストは、無血清培地中、酪酸ナトリウム有無条件下で培養した、1μMアフィジコリン処理CHO細胞で行った。その値は、1mlの細胞上清についてのもので、またそれは、コントロール(0%)に対する%値として表わされている(平均±SE, n=4)。t-PAは、イライザ法で測定された。

表 14

時間(培地交換後の時間)	アフィジコリン	+ 酪酸ナトリウム適用時間 (h)	
		0	24
96	36.7 ± 6.2	34.1 ± 9.7	50.6 ± 11.0
120	42.0 ± 8.8	31.8 ± 10.2	49.7 ± 4.3

(6-ヒドロキシ-4, 6-ジメチル-3-ヘプテン-2-オン(DHO)の効果)

上述化合物による処理から144時間後、t-PA生産が増加した。t-PA合成の促進には、マイクロモル濃度範囲、例えば0.005から100μMが効果的であった。

図19は、無血清培地及び7mMから7μM DHO中で168時間まで培養したCHO細胞における、t-PA生産の増加を示している。その値はDCAで測定されたものである。図20は、イライザ法で得られた、同様の値を示してある。

上述の方法で調製した細胞培養物は、例えば、生産期後その培養培地から細胞を分離し、その細胞上清を超速心及びクロマトグラフィー法によって精製する等の、従来法を使って、t-PAを単離するのに用いた。

その後、単離したt-PAを、例えば、溶解型又は、凍結乾燥型の薬学的調製法に成型する。

上記例は、t-PA生産CHO細胞を、上述のヨーロッパ及びドイツ特許出願にみられるような、

例えばt-P A変異体又は他の薬理的に有効なタンパク質のような他のタンパク質を外に出す、トランスホームしたCHO細胞、特にEP-A 199574及び196920及びDE-A 3708681におけるCHO細胞で置き換えて、繰返すことができる。

4. 図面の簡単な説明

図1は、7.5% FCSを含む培地中で培養したCHO細胞の細胞増殖を示す。細胞数は細胞上清1 mlのもので、総数は(-▼-)、生細胞は(-▽-)、死細胞は(-□-)で示される(平均±SE, n = 14 ~ 47)。

図2(A)及び(B)は、7.5% FCS含有培地で培養したCHO細胞におけるt-P A生産を示し、特に、図2(A)は、細胞外t-P A濃度の時間曲線を示す。t-P A値は1 mlの細胞上清のもので、DCA(-○-)とイライザ法(-●-)で測定した(平均±SE, n = 7 ~ 47)。

図2(B)は、細胞内t-P A濃度の時間曲線を示す。t-P A値は1 mlの細胞上清のもので、イライザ法で測定した(-■-) (平均±SE,

n = 4)。

図3(A)及び(B)は、7.5% FCS含有培地中で培養したCHO細胞におけるt-P A合成を示し、特に図3(A)は、細胞外t-P A濃度を示す。t-P A値は、 1×10^4 個の細胞についてのもので、DCA(-△-)及びイライザ法(-▲-)で測定した(平均±SE, n = 7 ~ 47)。

図3(B)は、細胞内t-P A濃度を示す。t-P A値は、 1×10^4 個の細胞についてのもので、イライザ法によって測定した(-■-) (平均±SE, n = 4)。

図4は、無培養培地で培養したCHO細胞の細胞増殖を示す。細胞数は1 mlの細胞上清のもので、総細胞数は(-▲-)、生細胞は(-△-)、死細胞は(-□-)で示されている(平均±SE, n = 4 ~ 6)。

図5は、無血清培地で培養したCHO細胞におけるt-P A生産を示す。t-P A値は1 mlの細胞上清についてのもので、DCA(-○-)及びイライザ(-●-)法で測定した(平均±SE,

n = 4 ~ 6)。

図6は、無血清培地で培養したCHO細胞におけるt-P A合成を示す。t-P A値は、 1×10^4 個の細胞についてのもので、DCA(-○-)及びイライザ法(-●-)によって測定した(平均±SE, n = 4 ~ 6)。

図7は、時間に対する、C、-C、モノカルボン酸によって引き起こされたCHO細胞におけるt-P A生産の増加を示す。細胞は、7.5% FCS含有培地で培養した。酪酸(-■-)及びイソ酪酸(-●-)の濃度は1 mM、またプロピオン酸(-○-)及びイソ吉草酸(-□-)の濃度は5 mMである。この値は1 mlの細胞上清についてのもので、酸を添加していないコントロール(0%)に対して、%値で表わしてある(平均±SE, n = 11 ~ 24)。t-P AはDCAで測定した。

図8は、酪酸ナトリウムを用いて達成されたCHO細胞におけるt-P A生産の増加を示す。7.5% FCS含有培地で培養した細胞に、0日目、1 mM濃度で酪酸ナトリウムを添加した。その値

はコントロール(0%)に対して、%値で表わしてあり、またこれは、1 mlの細胞上清(DCA(-■-)及びイライザ法(-□-))又は2 mlの細胞懸濁物(イライザ法(-▽-))についてのものである(平均±SE, n = 5 ~ 14)。

図9(A)、(B)、(C)は、7.5% FCS含有培地で培養したCHO細胞におけるt-P A合成に関する酪酸ナトリウムの影響を示す。酪酸ナトリウムは0日目、1 mM濃度で添加した。その値は、 1×10^4 個の細胞についてのもので(-□-, -○-, -▽-)、またそれは、コントロール培養との比較で得られたものである(-■-, -●-, -▼-) (平均±SE)。

図9(A)は、細胞外t-P A濃度(DCA, n = 5 ~ 14)を示し、図9(B)は、細胞外t-P A濃度(イライザ法, n = 5 ~ 8)を示し、図9(C)は、細胞内t-P A濃度(イライザ法, n = 5 ~ 8)を示す。

図10は、7.5% FCS含有培地で培養したCHO細胞におけるt-P A生産の増加を示す。

1 mMの酪酸ナトリウムを1度もしくは、異なる時間に2度添加した。この値は、コントロール(0%)に対する%値で表わされ、また、1 mlの細胞上清についての値である(平均±SE, n=4)。t-P Aは、DCAで測定した。

図11は酪酸ナトリウムで達成されたCHO細胞におけるt-P A生産の増加を示す。無血清培地における細胞の24時間培養の後、酪酸ナトリウムを1 mM濃度となるよう添加した。その値は、コントロール(0%)に対する%値で表わされ、またそれは、1 mlの細胞上清についてのものである。t-P Aはイライザ法で測定した(平均±SE, n=4)。

図12は、CHO細胞におけるt-P A生産に関する、酪酸ナトリウムの影響を示す。無血清培地での細胞の24時間培養後、酪酸ナトリウムを1 mM濃度となるよう添加した。この値は1 mlの細胞上清についてのもので、それはDCA(—■—)及びイライザ法(—□—)で測定した(平均±SE, n=4~6)。

mlの細胞上清についてのもので、コントロール(0%)に対する%値で表わされている(平均±SE, n=4~6)。t-P AはDCAで測定した。

図16は、種々の時間に、チオグリコール酸(1 mM)を1度又は2度適用した後、7.5% FCS含有培地で培養したCHO細胞でのt-P A生産の増加を示す。その値は、コントロール(0%)に対するパーセント値で表わされ、またその値は1 mlの細胞上清についてのものである(平均±SE, n=4~6)。t-P Aは、DCAで測定した。

図17(A)(B), (C)は、7.5% FCS含有培地で培養したCHO細胞におけるt-P A合成に関する1 mMチオグリコール酸の影響を示す。その値は、 1×10^5 個の細胞についてのもので(—□—, —○—, —△—)、それはまた、コントロール培養(—■—, —●—, —▲—)値と比較して示されている(平均±SE, n=4~5)。

図17(A)は、細胞外t-P A濃度(DCA)

図13は、CHO細胞におけるt-P A生産に関する酪酸ナトリウムの影響を示す。無血清培地での細胞の24時間培養後酪酸ナトリウムを1 mM濃度となるよう添加した。その値は 1×10^5 個の細胞についてのものであり、それは、DCA(—■—)及びイライザ法(—□—)によって測定した(平均±SE, n=4~6)。

図14は、7.5% FCS含有培地で培養したCHO細胞におけるt-P A合成(A)とタンパク質合成(B)に関するアスコルビン酸(10 mM)の影響を示す。t-P Aは、DCAで測定した。その値は(○)、コントロール値(●)と比較して表わされ、またその値は、 1×10^5 個の細胞についてのものである(平均±SE, n=4)。

図15は、時間に関する、チオグリコール酸(—●—)、チオジグリコール酸(—□—)、L-システイン(—■—)及びグルタチオン(—○—)の種々の含硫化合物によって引き起こされるCHO細胞におけるt-P A生産の増加を示す。細胞は、7.5% FCS含有培地で培養した。その値は、1

を示し、図17(B)は、細胞外t-P A濃度(イライザ法)を示し、図17(C)は、細胞内t-P A濃度(イライザ法)を示す。

図18は、培地交換後、無血清培地で培養した $1 \mu\text{M}$ アフィジコリン同調CHO細胞におけるt-P A生産の増加を示す。その値は、1 mlの細胞上清についてのもので、また、コントロール(0%)に対する%値で表わされている(平均±SE, n=4~9)。t-P AはDCAで測定した。

図19は、無血清培地及び7 mM~7 μM DHO条件下で168時間まで培養したCHO細胞におけるt-P A生産の増加を示している。その値はDCAで測定した。

図20は、イライザ法での測定以外は図19と同様にして行ったCHO細胞におけるt-P A生産の増加を示している。

図面の浄化(内容に変更なし)

FIG. 1

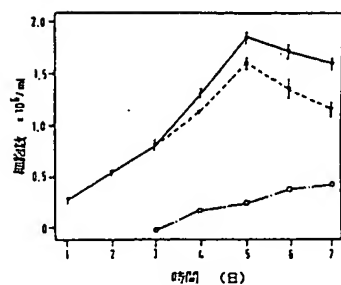


FIG. 2

(A)

(B)

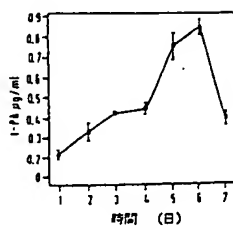
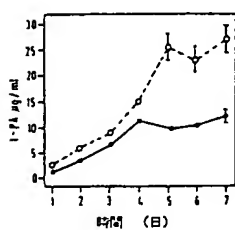


FIG. 3

(A)

(B)

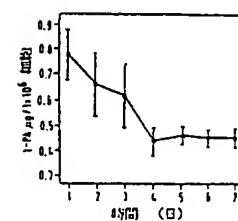
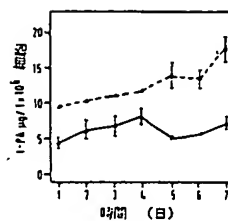


FIG. 4

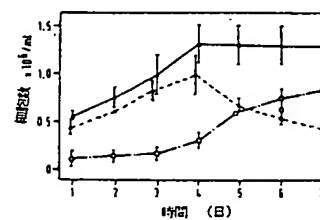


FIG. 5

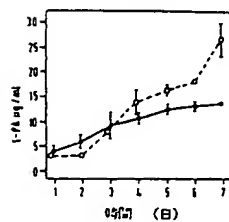


FIG. 6

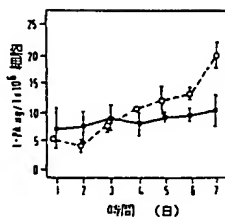


FIG. 7

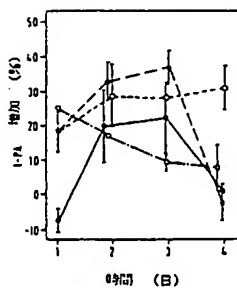


FIG. 8

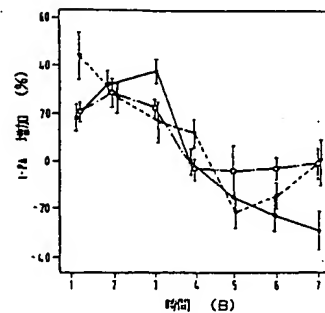
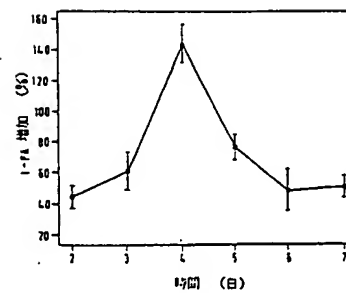


FIG. 11



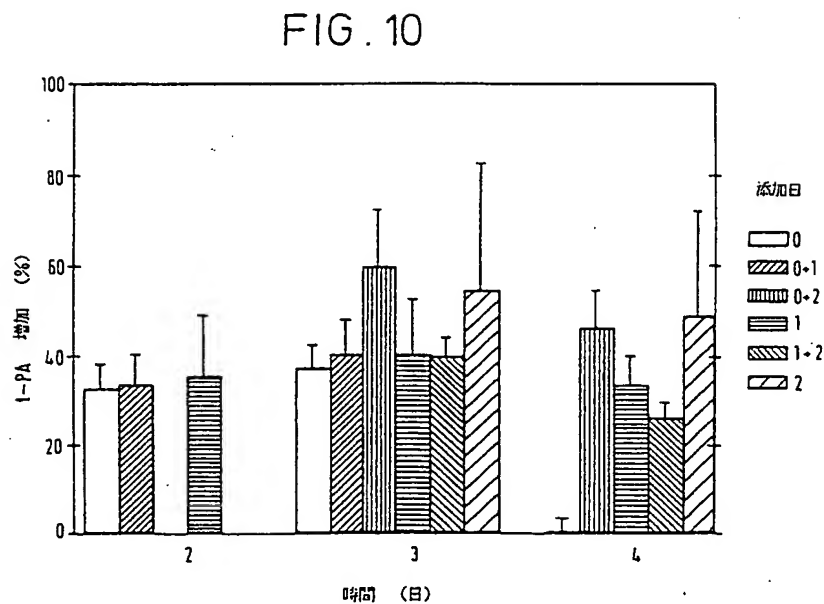
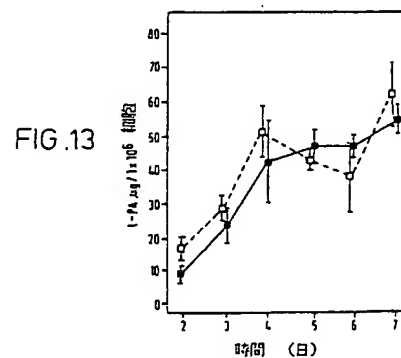
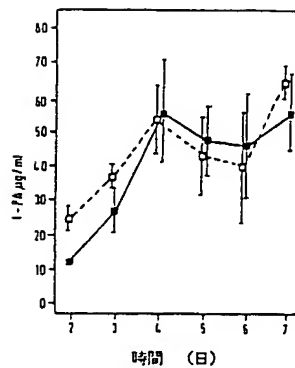
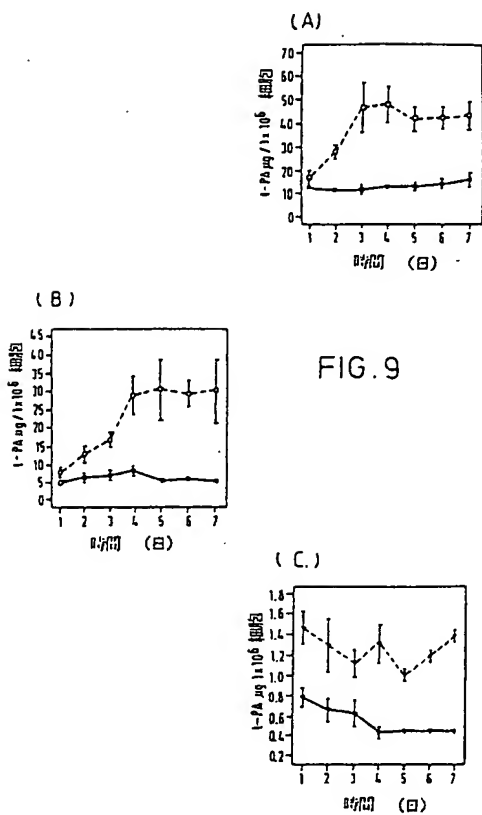


FIG. 14

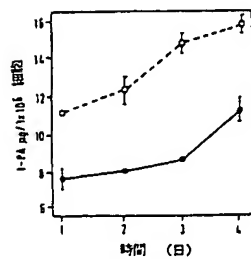
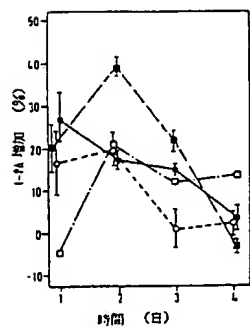


FIG. 15



(A)

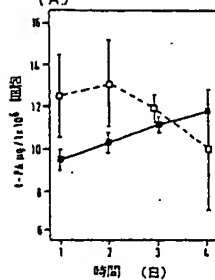
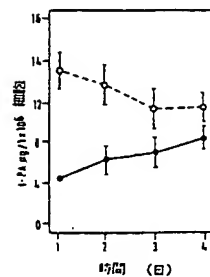


FIG. 17

(B)



(C)

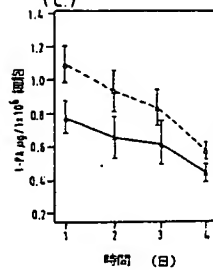


FIG. 16

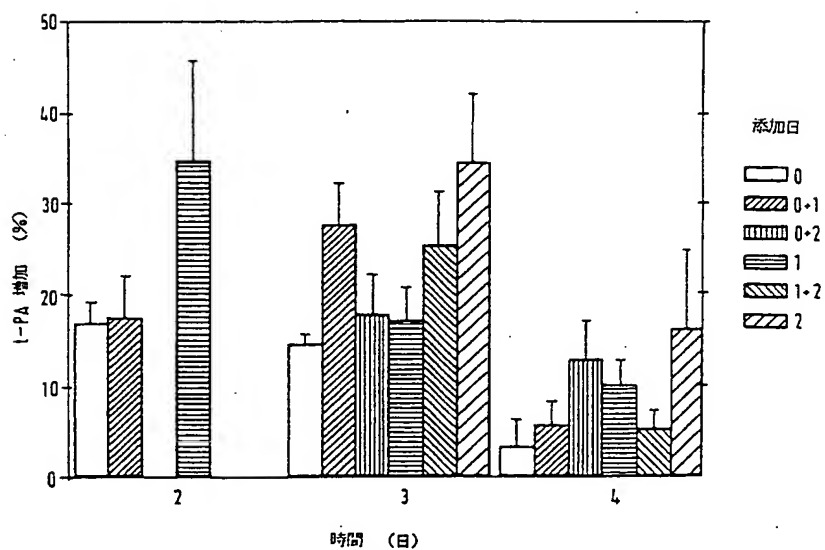


FIG. 18

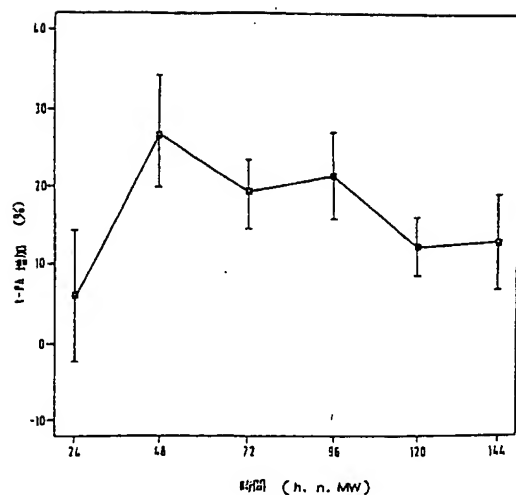


FIG. 19

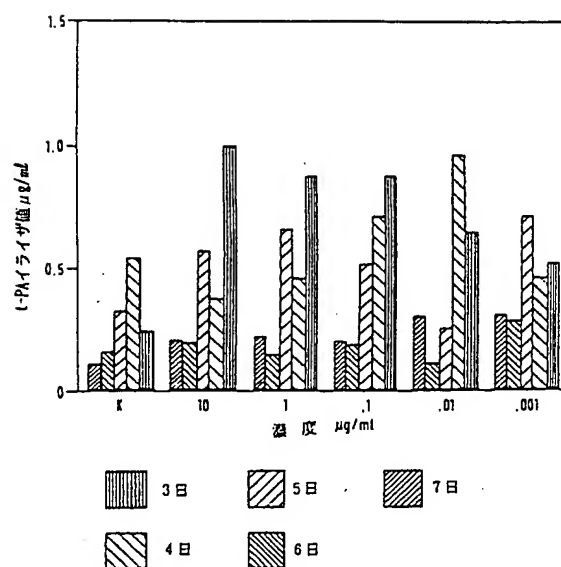
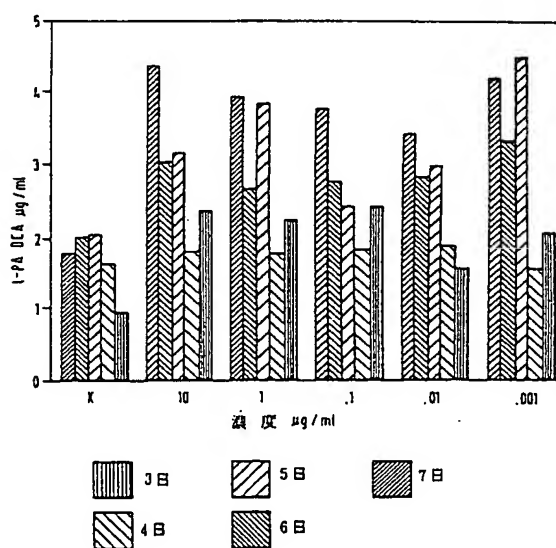


FIG. 20



第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 9/64
C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)

優先権主張 ⑫1987年11月13日⑬西ドイツ(DE)⑭P3738649.2

⑫1988年1月20日⑬西ドイツ(DE)⑭P3801562.5

⑯発明者 ヴィリアム ヴェルツ ドイツ連邦共和国 デー 7951 ヴアルタウゼン アム
エスパツハ 5

⑯発明者 ハンス ツエーナー ドイツ連邦共和国 デー 7400 テュービンゲン イム
ホップフエンガルテン 13

⑯発明者 アクセル ツエーク ドイツ連邦共和国 デー 3400 ゲツティンゲン ブリュ
ーデル グリム アレ 22

手続補正書(方式)

平成元年

3月1日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1. 事件の表示 昭和63年特許願第256882号

2. 発明の名称 タンパク質の調製法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称 ドクトル カルル トーマエ ゲゼルシャフト
ミット ベシュレンクテル ハフツング

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 211-8741

氏名(5995) 弁理士 中村 稔

5. 補正命令の日付 平成元年1月31日

6. 補正の対象 明細書 全図面

7. 補正の内容 別紙の通り

特許庁
1.3.2
願書に最初に添付した明細書及び
図面の浄書(内容に変更なし)